

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

REC'D 24 JUL 1995

WIPO PCT

BREVETS D'INVENTION

CERTIFICATS D'UTILITÉ - CERTIFICATS D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

Copie officielle

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme, d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris le 24 FEV. 1995

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division



Yves CAMPENON



THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

1

| | | |
|---|-------------------------------------|--|
| a | <input checked="" type="checkbox"/> | BREVET D'INVENTION |
| b | <input type="checkbox"/> | CERTIFICAT D'UTILITÉ |
| c | <input type="checkbox"/> | DEMANDE DIVISIONNAIRE |
| d | <input type="checkbox"/> | TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPEEN |

Pour c et d, précisez Nature N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ETABLISSEMENT DIFFERE
DU RAPPORT DE RECHERCHE

OUI

NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ECHELONNE DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

OUI

NON

NATURE

NUMERO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIECES

29 JUN 1994

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

94 08029 -

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

15 JAN 1991

4 NUMERO DU POUVOIR PERMANENT

15 janvier 1991

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A LA TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ETRE ADRESSEE

RHONE-POULENC RORER S.A.
Direction Brevets
20, av Raymond Aron
92165 Antony Cedex

5 REFERENCE DU CORRESPONDANT

ST 94051

6 TELEPHONE DU CORRESPONDANT

40 91 71 14

7 TITRE DE L'INVENTION

ADENOVIRUS COMPRENANT UN GENE CODANT POUR UNE SUPEROXYDE DISMUTASE

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

RHONE-POULENC RORER S.A.
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

N° SIREN

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

20, av Raymond Aron, 92160 Antony
3, rue Michel Ange, 75016 Paris
39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif

PAYS

France
France
France

10 NATIONALITÉ(S)

Française

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR

OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES

OUI

NON

X

DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

X

DE RAPPORT DE RECHERCHE

DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

X

DE REVENDICATION (à partir de la 11e)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMERO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES A LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir

Philippe BECKER

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ A LA RECEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

BA-540220993

Division Administrative des Brevets

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

ST 94051

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

9408029

Titre de l'invention :

ADENOVIRUS COMPRENANT UN GENE CODANT POUR UNE SUPEROXYDE DISMUTASE

Le (s) soussigné (s)

RHONE-POULENC RORER S.A., 20, av Raymond Aron, 92160 Antony, France
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, 3, rue Michel Ange, 75016 Paris,
France

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY, 39, rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom
patronymique) :

BARKATS Martine, 7, rue Nicolas Houel, 75005 Paris, France

MALLET Jacques, 18, rue Charcot, 75013 Paris, France

PERRICAUDET Michel, 31, rue de Chartres, 28320 Ecrosnes, France

REVAH Frédéric, 49, rue de Châtenay, Bât. Flandre 2, 92160 Antony, France

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Antony, le 29 juin 1994

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir

Philippe BECKER

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

| PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN | | | R.M.* | DATE DE LA CORRESPONDANCE | TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR |
|--|--------------|------------|-------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Modifiée(s) | Supprimée(s) | Ajoutée(s) | | | |
| 24 et 16 | | | | 10/10/94 | 19 OCT. 1994 C J |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comprenant une séquence d'ADN codant pour une superoxyde dismutase et ses utilisations en thérapie génique.

5 L'oxygène occupe une place essentielle dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques. La réduction de l'oxygène moléculaire provoque la formation d'espèces chimiques hautement réactives comme le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle. Ce dernier, formé à partir du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Haber-Weiss, est le radical libre le
10 plus réactif. De part la présence d'un électron libre dans leur couche externe, ces radicaux sont hautement réactifs. Cette réactivité peut être préjudiciable à l'égard de molécules biologiques importantes telles que l'ADN, des protéines cellulaires essentielles et les lipides membranaires. En outre, ces radicaux libres peuvent initier des réactions en chaîne telle qu'une peroxydation lipidique qui peut altérer l'intégrité
15 des cellules et causer leur destruction.

Une série de mécanismes de défense antioxydants existe naturellement pour réguler cette production de radicaux libres et prévenir des dommages de tissus et/ou cellules.

C'est ainsi que la formation de ces entités hautement réactives est normalement
20 régulée ou inhibée par une dismutation de l'ion superoxyde, par l'enzyme superoxyde dismutase, en peroxyde d'hydrogène, ce dernier étant ensuite converti en eau et oxygène par soit la glutathion peroxidase soit la catalase.

Malheureusement, sous certaines conditions, ces mécanismes de régulation ne sont pas totalement efficaces. Il s'en suit un excès en radicaux libres qui entraîne des
25 pathologies de type inflammations, emphysèmes, néoplasmes ou rétinopathies. Il est ainsi aujourd'hui reconnu que ces radicaux libres interviennent au niveau de l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, la cirrhose du foie, le diabète, la formation de cataracte, dans un certain nombre de maladies neurologiques incluant la maladie de Parkinson et l'ischémie cérébrale, au niveau de la trisomie 21, ainsi que
30 dans le processus de vieillissement. Enfin, l'anion superoxyde semble également être impliqué dans la pathogénèse de l'hypertension pulmonaire induite par TNF (Tumor Necrosis Factor).

La présente invention a précisément pour objet de proposer un moyen pour suppléer à ce type de déficience des mécanismes de régulation naturels et ceci en
35 intervenant plus particulièrement au niveau de l'activité de la superoxyde dismutase.

Comme explicité précédemment, la fonction principale de cette enzyme, chez les mammifères, est de détruire les radicaux superoxydes qui sont générés lors des diverses réactions biologiques d'oxydoréduction. Cette enzyme est par conséquent particulièrement importante puisqu'elle procure une défense contre les toxicités à l'oxygène et tout dommage pouvant être causé aux cellules par des hydrocarbures carcinogènes.

La superoxyde dismutase est en fait une variété de différentes enzymes présentes chez la plupart des êtres vivants. Il existe trois formes de SOD, avec des distributions distinctes et caractérisées chacune par la nature de leur composant métal: la CuZnSOD intracellulaire spécifique des eucaryotes, la MnSOD dépendante du manganèse et produite au niveau des mitochondries chez les eucaryotes et procaryotes (Creagan R. et al. Humangenetic 20 203-209 1973) et la FeSOD, dépendante du fer, cytosolique et présente essentiellement chez les procaryotes (Hendrickson D et al. Genomics 8, 736-738 1990). Il existe également une SOD à cuivre et zinc extracellulaire.

La CuZn superoxyde dismutase intracellulaire, dite SOD1, constitue approximativement 85 à 90% de la totalité de l'activité SOD cellulaire. Il s'agit d'une protéine dimère, composée apparemment de deux sous-unités identiques, liées de manière non covalente, chacune d'entre-elles ayant un poids moléculaire de l'ordre de 16.000 à 19.000 (Lieman-Hurwitz J. et al; Biochem Int. 3:107-115, 1981). Le locus pour la superoxyde dismutase cytoplasmique humaine se trouve sur le chromosome 21. (Tan Y.H. et al. J. Exp. Med. 137: 317-330, 1973).

Normalement, la CuZn superoxyde dismutase endogène est présente dans les tissus dans des quantités limitées et lorsque des quantités importantes en anions superoxyde sont produites, sa concentration s'avère nettement insuffisante.

Par ailleurs, il a récemment été démontré que des mutations ponctuelles au niveau du gène CuZnSOD humain étaient associées au développement d'une pathologie, la sclérose latérale amyotrophique (ALS). Cette maladie grave se traduit par une dégénérescence léthale des neurones moteurs dans le cerveau et la moelle épinière. Ces mutations affectent l'activité de l'enzyme correspondante CuZnSOD (Deng H. X. et al, Science, 261, 1047 1993).

Il y a donc aujourd'hui un besoin en CuZnSOD exogène pour des administrations cliniques afin de suppléer à de telles carences ou anomalies.

Inversement, sous certaines conditions, une concentration trop élevée en SOD peut être toxique à l'égard des cellules la produisant. La SOD est une enzyme de

protection assurant normalement un niveau minimal en radicaux superoxyde au sein de la cellule. Pour ce faire, elle catalyse l'interaction de radicaux libres en vue d'en oxyder un et de réduire l'autre, soit une réaction de dismutation, qui conduit à la formation d'eau oxygénée. En soit, le radical superoxyde n'est pas particulièrement toxique. Le danger vient de sa capacité à interagir avec l'eau oxygénée pour générer de l'oxygène singulet et des radicaux hydroxyle, deux formes hautement réactives et extrêmement toxiques de l'oxygène. Une quantité accrue en superoxyde dismutase peut donc conduire à une production accrue en eau oxygénée avec les conséquences explicitées précédemment. Ce phénomène se traduit notamment physiologiquement par une augmentation de la lipoperoxydation avec diminution de la teneur en acide gras insaturés des membranes cellulaires et pour conséquence principale une perturbation des fonctions membranaires.

Dans ce dernier cas, il serait donc avantageux de pouvoir réguler l'activité de la superoxyde dismutase soit par exemple à l'aide d'antisens ou de mutants dominants négatifs.

Le potentiel clinique de l'enzyme superoxyde dismutase est par conséquent considérable et il serait particulièrement important de pouvoir contrôler efficacement son activité soit en la stimulant, la réprimant ou en y suppléant.

Plus précisément, la présente invention réside dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives du gène spécifique codant pour une superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés.

Dans la demande copendante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés comme vecteur pour le transfert d'un gène étranger in vivo dans le système nerveux et l'expression de la protéine correspondante.

La présente invention concerne plus particulièrement des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour contrôler l'expression de la superoxyde dismutase.

Plus précisément, elle se rapporte à un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN propre à contrôler l'expression de la superoxyde dismutase, sa préparation et son utilisation pour des traitements thérapeutiques et/ou la prévention de diverses pathologies.

La demanderesse a ainsi mis en évidence qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour une superoxyde

dismutase, d'administrer ces adénovirus recombinants *in vivo*, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de la superoxyde dismutase *in vivo*.

5 Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant déficient comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés.

10 La superoxyde dismutase produite dans le cadre de la présente invention peut être une superoxyde dismutase humaine ou animale. Selon un mode de réalisation privilégié de l'invention, il s'agit de l'une des trois formes de la superoxyde dismutase humaine précédemment décrites, CuZnSOD (SOD₁), MnSOD (SOD₂) et SOD extracellulaire (SOD₃). Plus préférentiellement, la séquence d'ADN intégrée dans l'adénovirus selon l'invention code pour tout ou une partie active de la CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire, hSOD1, ou l'un de ses dérivés.

15 La séquence d'ADN codant pour la superoxyde dismutase, utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques.

20 De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg. Selon un mode préféré de l'invention, il s'agit d'une séquence d'ADN génomique (ADNg) codant pour une superoxyde dismutase. Son utilisation peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

25 Bien entendu, préalablement à son incorporation dans un vecteur adénovirus selon l'invention, la séquence d'ADN peut être avantageusement modifiée, par exemple par mutagenèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes.

30 Au sens de la présente invention, on entend par dérivé de la superoxyde dismutase, toute séquence obtenue par modification et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques de la superoxyde dismutase. Par modification, on doit entendre toute mutation, substitution, délétion, addition ou

modification de nature génétique et/ou chimique. Ces modifications peuvent être réalisées par les techniques connues de l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après). Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant
 5 comme sonde la séquence native ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée in vivo, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou
 10 éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés
 15 comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction.

Par dérivé de la superoxyde dismutase on entend également couvrir dans le cadre de la présente invention, les mutants dits dominants négatifs de la superoxyde dismutase. Plus précisément, dans ce cas, le gène cloné est altéré de manière à ce qu'il
 20 code pour un produit mutant capable d'inhiber l'activité cellulaire de la superoxyde dismutase sauvage. Ce type de dérivé est particulièrement intéressant lorsque l'on cherche par exemple à réprimer une surexpression naturelle de la superoxyde dismutase.

La séquence d'ADN, codant pour tout ou partie de la superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés, peut également être une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de la superoxyde dismutase. Préférentiellement, la séquence d'ADN hétérologue comporte un gène codant pour un
 25 ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm correspondant. La
 30 séquence antisens peut être tout ou seulement une partie de la séquence d'ADN, codant pour la superoxyde dismutase, insérée dans l'orientation inverse dans le vecteur selon l'invention.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la séquence d'ADN, codant pour la superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés, intègre également un

signal de sécrétion permettant de diriger la superoxyde dismutase synthétisée dans les voies de sécrétion des cellules infectées. De cette manière, la superoxyde dismutase synthétisée est avantageusement libérée dans les compartiments extracellulaires. Toutefois, il peut également s'agir d'un signal de sécrétion hétérologue ou même
 5 artificiel. Dans le cas particulier de la forme SOD₃, le signal de sécrétion peut être avantageusement le propre signal de SOD₃.

Avantageusement, la séquence codant pour la superoxyde dismutase est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules cibles. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de
 10 signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression de la superoxyde dismutase. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De
 15 même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux
 20 d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules cibles, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule cible.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour la
 25 CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour la CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire sous le contrôle du promoteur
 30 LTR-RSV.

Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour la CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire ou un dérivé de celle-ci sous le contrôle

d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les tissus cibles et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour la superoxyde dismutase.

Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus préférentiellement, comme indiqué ci-avant, le génome du virus recombinant défectif selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 non fonctionnel.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour la superoxyde dismutase. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences

capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la
 5 partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente demande par référence.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon
 10 les techniques classiques de biologie moléculaire.

Les propriétés particulièrement avantageuses des vecteurs de l'invention découlent notamment de la construction utilisée (adénovirus défectif, délété de certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour la superoxyde dismutase (promoteur viral ou tissu-spécifique de préférence), et
 15 des méthodes d'administration dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés de la superoxyde dismutase.

La présente invention concerne également toute utilisation d'un adénovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des pathologies précédemment citées. Plus
 20 particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces adénovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives comme par exemple la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (ALS), et la trisomie 21. Ils peuvent être également avantageusement utilisés dans le traitement de l'athérosclérose, des
 25 maladies cardiovasculaires, de la cirrhose du foie, du diabète, de la formation de cataracte ainsi que du processus de vieillissement.

On peut en outre, parfaitement envisager de procéder à une administration conjointe d'un adénovirus selon l'invention avec au moins un second adénovirus comportant un gène codant pour la catalase (P. Amstad et al. Biochemistry 1991, 30,
 30 9305-9313), autre enzyme importante dans la régulation de la production en radicaux libres.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant au moins un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que

décrits précédemment, associé, le cas échéant, à un adénovirus recombinant comportant un gène codant pour la catalase..

5 Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-
cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions
pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement
acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe chez
le patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de
compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau
10 stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des
maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus
recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une
méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration
15 stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Les doses d'adénovirus recombinant déficient utilisées pour l'injection peuvent
être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode
d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement
recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont
20 formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de
préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au
pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture
cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages
de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale
25 sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par
un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus
particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée
par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes,
30 hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules Gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-
ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises
en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus
particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de

biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention
5 peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire de la superoxyde dismutase. L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En
10 particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme
15 du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon
20 l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

25 Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les
30 glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, l'agarose etc.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent

soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

5 Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou
10 inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être
15 contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression de la superoxyde dismutase in vivo. La présente invention offre ainsi une nouvelle
20 approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention de nombreuses pathologies comme celles citées précédemment.

Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules cibles, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection,
25 ce qui évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines. Ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les murins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

Les exemples sont présentés ci-après à titre illustratif et non limitatif du domaine de l'invention.

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagénèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1 : Protocole de construction des vecteurs pLTRIX-hSOD1, pLTRIX-hSOD1 Gly37, et pLTRIX-hSOD1Asn139

5 Ces vecteurs contiennent les séquences codant pour la SOD1 humaine type sauvage ou mutée sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus permettant la recombinaison *in vivo*.

Les ADNc codant pour les différents types de SOD mis en oeuvre sont décrits dans Rosen et al., Nature, vol. 362, 52-62, et Deng et al., Science, vol. 261, 1047-1051.

10 Chaque ADNc est inséré dans un plasmide Bluescript (Stratagène) entre les sites PstI et HindIII. Une séquence de polyadénylation provenant de SV40 a auparavant été introduite dans le site XhoI du même plasmide. Ces plasmides ont pour nom SK-hSOD-PolyA, SK-hSODgly-PolyA et SK-hSODasn-PolyA.

15 Les vecteurs pLTRIX-hSOD1, pLTRIX-hSOD1gly et pLTRIX-hSOD1 sont obtenus en introduisant dans le site EcoRV du plasmide pLTRIX un insert obtenu par coupure de SK-hSOD-PolyA, SK-hSODgly-PolyA et SK-hSODasn-PolyA par KpnI et SacI (extrémités KpnI et SacI rendues franches).

Exemple 2 : Construction d'adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour la CuZn superoxyde dismutase intracellulaire humaine.

20 Le vecteur pLTR IX-hSOD1 est linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en trans les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

25 Plus précisément, l'adénovirus Ad-hSOD1 a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pLTR IX-hSOD1, selon le protocole suivant : le plasmide pLTR IX-hSOD1 et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinaison a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinaison non purifié ayant un titre d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
4. Adénovirus selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour une superoxyde dismutase humaine.
5. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour la CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire, SOD1 ou l'un de ses dérivés.
6. Adénovirus selon l'une des revendication 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour un mutant dominant négatif d'une superoxyde dismutase humaine.
7. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence antisens dont l'expression permet de contrôler l'expression du gène codant pour la superoxyde dismutase.
8. Adénovirus selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm de la superoxyde dismutase.
9. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules cibles.
10. Adénovirus selon la revendication 9 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.

12. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNg codant pour la CuZn superoxyde dismutase intracellulaire humaine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.
- 5 13. Adénovirus selon la revendication 1 comprenant une séquence d'ADNg codant pour la CuZn superoxyde dismutase intracellulaire humaine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.
14. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 13 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.
- 10 15. Adénovirus selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.
16. Adénovirus selon la revendication 14 ou 15 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.
- 15 17. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 16 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.
18. Utilisation selon la revendication 17 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington, de l'ALS, de la trisomie 21.
- 20 19. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 16.
20. Composition pharmaceutique selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un adénovirus comportant un gène codant pour la catalase.
- 25 21. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 19 à 20 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.
22. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 19 à 21 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

23. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 16.

24. Cellule selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.

5 25. Cellule selon la revendication 24 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type rétinienne, fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule Gliales ou kératynocyte.

26. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 23 à 25 et une matrice extracellulaire.

10 27. Implant selon la revendication 26 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine et les lectines.

15 28. Implant selon les revendications 26 ou 27 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.

29. Implant selon la revendication 28 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.

REVENDEICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant au moins une séquence d'ADN codant pour tout ou une partie active d'une superoxyde dismutase ou l'un de ses dérivés.
5
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
3. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
- 10 4. Adénovirus selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour une superoxyde dismutase humaine.
5. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour la CuZn superoxyde dismutase humaine intracellulaire, SOD1 ou l'un de ses dérivés.
- 15 6. Adénovirus selon l'une des revendication 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour un mutant dominant négatif d'une superoxyde dismutase humaine.
7. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence antisens dont l'expression permet de contrôler l'expression du
20 gène codant pour la superoxyde dismutase.
8. Adénovirus selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un gène codant pour un ARN antisens capable de contrôler la traduction de l'ARNm de la superoxyde dismutase.
9. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce que la
25 séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules cibles.
10. Adénovirus selon la revendication 9 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.

11. Adénovirus selon la revendication 10 comprenant une séquence d'ADNg codant pour la CuZn superoxyde dismutase intracellulaire humaine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.
12. Adénovirus selon la revendication 10 comprenant une séquence d'ADNc
5 codant pour la CuZn superoxyde dismutase intracellulaire humaine sous le contrôle d'un promoteur LTR-RSV.
13. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.
- 10 14. Adénovirus selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.
- 15 15. Adénovirus selon la revendication 13 ou 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.
16. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.
17. Utilisation selon la revendication 16 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie
20 de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington, de l'ALS, de la trisomie 21.
18. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 15.
19. Composition pharmaceutique selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un adénovirus comportant un gène codant pour la catalase.
- 25 20. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 18 à 19 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.
21. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 18 à 20 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

22. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 15.

23. Cellule selon la revendication 22 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.

5 24. Cellule selon la revendication 23 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type rétinienne, fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule Gliales ou kératynocyte.

25. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 22 à 24 et une matrice extracellulaire.

10 26. Implant selon la revendication 25 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine et les lectines.

15 27. Implant selon les revendications 25 ou 26 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.

28. Implant selon la revendication 27 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.